



# Mendel uppdateras

Text: Britt-Marie Lidesten 

*Den förste som systematiskt studerade ärftliga skillnader hos ärtor var Gregor Johann Mendel (1822–1884). Med utgångspunkt i korsningsförsök med ärtor som Mendel odlade i klostret i Brno, nuvarande Tjeckien, kunde han visa de grundläggande principerna för nedärvning av egenskaper.*

I klassisk genetikundervisning brukar ingå att man studerar Mendels korsningsförsök. Exempelvis skrynkliga ärtor som korsas med släta, eller gula ärtor med gröna. Det är väl valda exempel för att förstå begrepp som homozygot och heterozygot, respektive dominant och recessiv. Men vilken är den genetiska bakgrunden till de olika fenotyperna hos ärtorna?

I det följande presenteras en serie undersökningar som visar morfologiska, biokemiska och genetiska skillnader hos släta och skrynkliga ärtor. Uppgifterna knyter an till flera delområden i biologi samtidigt som de bildar en helhet. Utifrån detta exempel ges ett helhetsperspektiv på sambandet mellan egenskap–protein–DNA och en koppling mellan Mendels klassiska genetik och dagens kunskap inom molekylärgenetik, bioinformatik och biokemi. Uppgifterna kan göras i sin helhet, men det går även utmärkt att välja de som är relevanta utifrån tillgänglig tid, tillgång till utrustning och elevernas kunskapsnivå.

Undersökningarna börjar med yttre och inre skillnader hos ärtsorterna, både hos torkade ärtor

och blötlagda. Här används mikroskop för att studera utseendet av de stärkelselagrande organellerna (amyloplaster), som uppvisar tydliga skillnader mellan spritärt och mägärt.

De biokemiska skillnaderna studeras via diagram och reaktionsserier. Det är svårt att visa tydliga skillnader genom enkla praktiska försök.

De genetiska skillnaderna kan illustreras på flera sätt. Mest avancerat genom PCR och gelelektrofores, men betydligt enklare är att visa skillnaderna med en liten bioinformatikövning.

En utvidgning som passar väl in är att utifrån givna exempel visa nedärvningen av egenskaper med klassiska korsningsförsök och  $\chi^2$ -test.

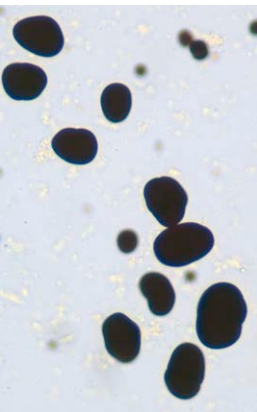
Vi har inte försökt upprepa Mendels korsningsförsök i praktiken, det är ju tyvärr en tidskrävande procedur, men testa gärna och rapportera till oss hur det går!

Slutligen är det dags att tolka resultaten från de olika undersökningarna. Hur kommer det sig att mägärtor är skrynkliga medan spritärtor är släta? Och vad är det som gör att de skrynkliga mägärtorna har odlats och bevarats som sort sedan Mendels tid? En sammanfattning med kommentarer avslutar artikeln.

Laborationerna och övningarna har utarbetats och sammanställts av Bioresurs inför Bioresursdagarna 12–13 november 2018 och har även använts under Sverigefinalen vid uttagningen till den internationella EUSO-tävlingen.

Fullständiga beskrivningar av försöken finns på vår hemsida i anslutning till detta nummer av Bi-lagan.





## A. Skillnader i utseende

Börja med att jämföra torkade frön av spritärt och mägärt. Hur skiljer de sig åt?

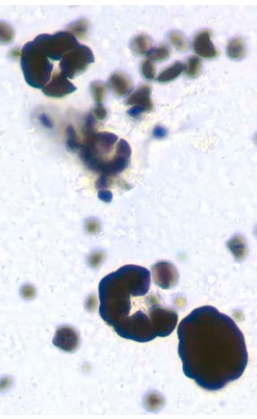
**Resultat:** Det är lätt att se att mägärtor är skrynkliga och spritärtor är runda och släta. Men det finns alltid en viss variation som kan bero på ärtornas mognadsgrad varierat vid skörd.

Nästa fråga att fundera över är om skillnaden i utseende hänger ihop med olika förmåga att ta upp vatten.

10 spritärtor och 10 mägärtor väljs ut och alla ärtor av respektive sort vägs tillsammans, placeras i varsin flaska och täcks med lika mycket vatten. Låt flaskorna stå i ett dygn. Hur ser de två ärtsorterna ut jämfört med innan de lades i vatten?

Ta upp ärtorna, placera respektive ärtsort på hushållspapper och torka av dem. Väg alla ärtorna av respektive sort tillsammans. Beräkna den procentuella ökningen i vattenhalt.

**Resultat:** Frön av både mägärt och spritärt är runda och släta. Beräkningen av vattenhalt visar att mägärt tagit upp betydligt mer vatten är spritärt.



Preparaten har färgats med jod-lösning och fotograferats i 400 gångers förstoring.

Överst:

Normala, runda amyloplaster från spritärt.

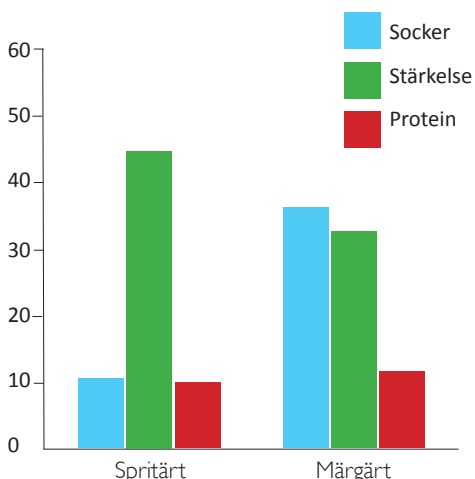
Nederst:

Amyloplasterna i mägärt är oregelbundna i formen och består av flera delar. Många små fragment av amyloplaster syns i bakgrunden.

## B. Biokemiska skillnader

Diagrammet nedan visar halterna av socker, stärkelse och protein i spritärt och mägärt i en undersökning. Vi kan se att det inte är någon väsentlig skillnad i proteinhalt, men att mägärt skiljer sig från spritärt genom att stärkelsehalten är något mindre och sockerhalten betydligt högre. Dessa skillnader kan antas bero på stärkelsesyntesen, en mycket komplicerad biokemisk process som sker stegvis, där varje steg styrs av ett specifikt enzym.

Glycerinaldehyd-3-fosfat (G3P) bildas i den del av fotosyntesen som kallas Calvinykeln. Med utgångspunkt i G3P kan antingen stärkelse eller sackaros bildas. Men bildning av sackaros är en komplicerad process med olika reaktionsvägar och beskrivs inte här.



Ref: Tracey Rayner m.fl. (2017) Genetic Variation Controlling Wrinkled Seed Phenotypes in *Pisum*: How Lucky Was Mendel? *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1205; doi:10.3390/ijms18061205. www.mdpi.com/journal/ijms

Vi har nu sett att det finns yttre skillnader mellan ärtsorterna, men finns det några mikroskopiska skillnader?

Låt frön av spritärt och mägärt ligga i vatten över natten.

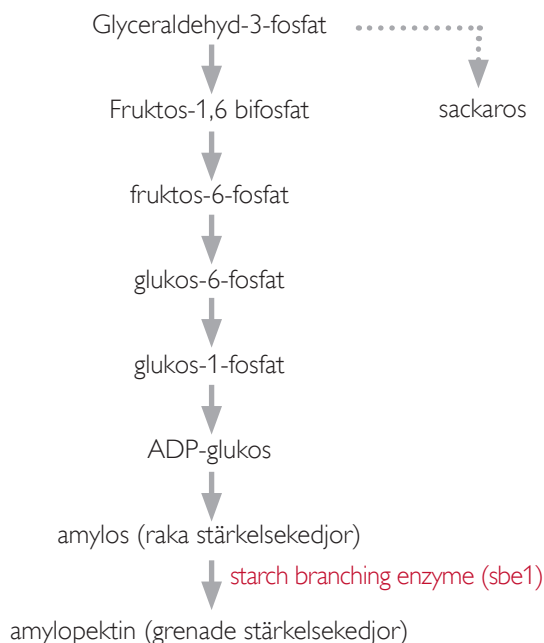
Placera en liten droppe vatten på två objektglas märkta med ärtsorternas namn. Använd en kniv och skrapa på ärtorna så att lite material frigörs och blanda med vattnet. (Ta inte med det yttre skalet på ärtorna.) Tillsätt en droppe jod-jod-kalium-lösning till ärtsuspensionerna.

Studera i mikroskop på 400x förstoring. Jämför amyloplaster från ärtsorterna och rita hur de ser ut. Sammanfatta resultatet av mikroskopstudierna.

**Resultat:** Mikroskopbilderna visar tydliga skillnader i form och storlek. Amyloplaster hos spritärt är större och jämna i formen, medan amyloplasterna hos mägärt är oregelbundna i storlek och ofta sitter flera mindre delar ihop. Se foton till vänster. (Amyloplaster är en typ av organell som lagrar stärkelse.)

Två former av stärkelse kan bildas: amylos har raka kedjor och amylopektin har grenade kedjor. Vad händer om starch branching enzyme (sbe1) saknas? Förklara med hjälp av reaktionsserien nedan i relation till diagrammet

**Resultat:** Om enzymet sbe1 saknas kommer endast amylos att bildas. Dessutom blir sockerhalten högre och den totala stärkelsehalten lägre.



Referens: Evo-Ed Project at Michigan State University, www.evo-ed.com. Sök på "The Case of Seed Taste Evolution in Pea Plants"

## C. Genetiska skillnader

En undersökning av variationer hos genen som bildar starch branching enzyme (sbe1) är fullt möjlig att göra om man har tillgång till en PCR-apparat och gelelektroforesutrustning. En fullständig beskrivning av metodiken finns på vår hemsida och nedan ges endast en översikt över arbetsgången.

Börja med att odla upp plantor av spritärt och mörghärt, vilket tar cirka två veckor. Därefter görs en extraktion av DNA ur bladen från respektive planta, med exempelvis Chelex-kulor eller ett mer avancerat kommersiellt kit. DNA-materialet amplifieras med PCR och primrarna väljs så att genen *SBE1* amplifieras. De bildade fragmenten separeras sedan med gelelektrofores och vandringssträckorna jämförs med en DNA-stege med kända fragmentstorlekar.

Resultatet av gelelektroforesen syns till höger. Banden som är intressanta i sammanhanget är det kraftiga bandet hos spritärt som motsvarar drygt 500 baspar och det svaga bandet hos mörghärt vid drygt 1 000 baspar. Vi kan konstatera att dessa båda band inte har någon motsvarighet hos den andra ärtsorten.

*Resultat:* Nukleotidsekvensen för genen *SBE1* hos mörghärt är betydligt längre än sekvensen hos spritärt.

### Bioinformatikövning

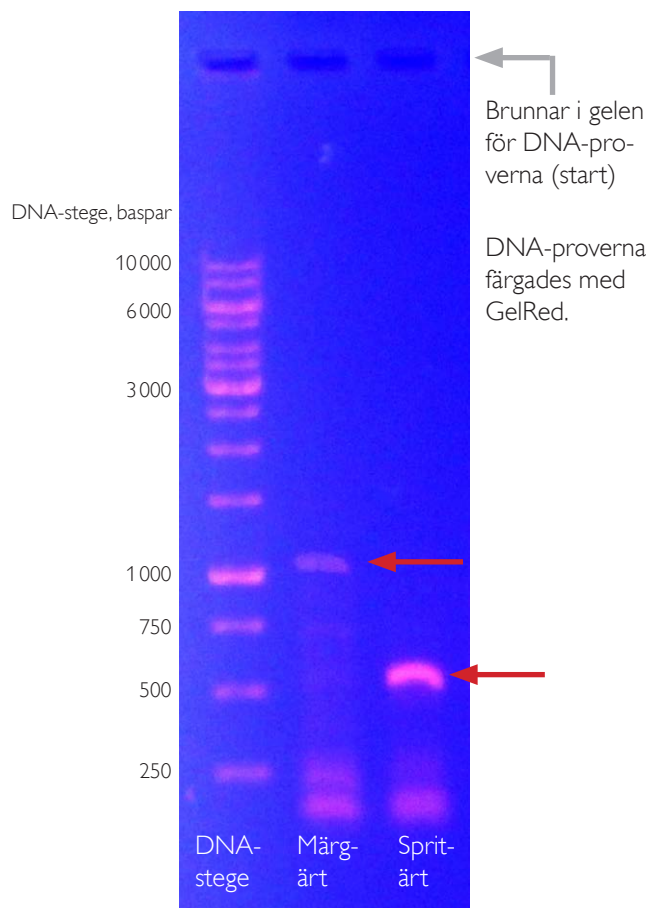
I denna uppgift jämför vi nukleotidsekvensen för genen *SBE1* hos spritärt och mörghärt. Öppna webbsidan [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) och välj Global Align en bit ner på sidan.

På vår hemsida finns nukleotidsekvensen för genen *SBE1* hos spritärt och motsvarande sekvens hos mörghärt, se *Resurser, Genetik och bioinformatik, Övningar i bioinformatik*. Kopiera och klistra in hela sekvensen för spritärt i den första rutan (Query). I den andra rutan (Subject) klistrar du in hela sekvensen från mörghärt. Klicka sedan på Align.

Programmet kommer nu att jämföra DNA-sekvenserna och placera dem ovanför varandra så att nukleotider med bäst överensstämmelse hamnar ovanför varandra. Efter en liten stund syns resultatet längst ner på sidan. Hur skiljer sig sekvenserna åt?

*Resultat:* Det finns ett gap i sekvensen från spritärt där nukleotiderna från mörghärt inte har någon motsvarighet. Sekvensen för spritärt är betydligt kortare än sekvensen från mörghärt, vilket stämmer överens med PCR/gelelektroforesen ovan.

Vilken av ärtsorterna är genetiskt defekt? Besvara frågan utifrån resultaten från de genomförda undersökningarna. Kommentarer och förklaringar finns på nästa sida.



### Klassisk genetik och $\chi^2$ -test

Det är självklart intressant att koppla till Mendels klassiska korsningsförsök. Förslagsvis kan man ange ett resultat i form av antal skrynkliga och släta frön som bildas i korsningsförsök enligt nedan och be eleverna fundera ut anlagen, rita korsningsschema och utvärdera detta med  $\chi^2$ -test.

#### Korsning 1

Plantor som bildar släta frön korsas med plantor med skrynkliga frön. Resultatet blir att alla plantor får släta frön.

#### Korsning 2

Plantor som bildats i ovanstående korsning korsas med varandra.

#### $\chi^2$ -test

Ett  $\chi^2$ -test kan användas för att bedöma i vilken grad ett försöksresultat överensstämmer med det förväntade resultatet (hypotesen).

Resultatet från korsning 2 blev 81 skrynkliga frön och 267 släta frön. Vilket är det förväntade teoretiska resultatet av korsning 2?

Undersök med  $\chi^2$ -test om fördelning släta/skrynkliga frön i korsning 2 skiljer sig signifikant från den förväntade fördelningen. Enkla program på nätet kan användas, exempelvis *Chi-Square Calculator for Goodness of Fit* från Social Science Statistics.

## En transposon skadar genen

I de klassiska korsningsförsök som Gregor Johann Mendel genomförde med släta och skrynkliga ärtor, beror fenotyperna på två varianter av genen *SBE1* i lokuset *rugosus*. Den normala, dominanta varianten av genen *SBE1* (betecknas *R*) kodar för ett enzym (starch-branching enzyme, *sbe1*). Enzymet krävs för bildning av amylopektin, den variant av stärkelsemolekyl som har många förgreningar.

Skrynkliga ärtor är homozygota för en recessiv variant av genen *SBE1* (genotyp *rr*). Hos dessa ärtor bildas inte starch-branching enzyme (*sbe1*), vilket innebär minskad stärkelseproduktion, en större andel amylos (ogrenade stärkelsemolekyler), högre sockerhalt och skrynkliga frön.

Det är tillräckligt med en normal allel av *SBE1*-genen för att tillräcklig produktion av *sbe1*-enzymet ska uppnås. Båda genotyperna homozygot (*RR*) och heterozygot (*Rr*) har därför samma fenotyp.

Mikroskopstudierna (uppgift A) visar att amyloplasma som lagrar stärkelse är förkrympta hos mörkgrön, med oregelbunden form och varierande storlek i jämförelse med amyloplasma hos spritärt som generellt är större och jämna i formen.

Orsaken till skillnaderna i enzymproduktion hos släta och skrynkliga ärtor är att *SBE1*-genen hos skrynkliga frön innehåller en extra nukleotidsekvens. Detta ser vi genom undersökningarna av de genetiska skillnaderna (C)

ovan. PCR-laborationen och bioinformatikövningen visar båda att den aktuella genen har en längre nukleotidsekvens hos mörkgrön.

Detta beror på en transposon (insertion). Effekten av insertionen blir att genen inte fungerar och bildningen av enzymet *sbe1* stoppas, vilket medför att grenade stärkelsemolekyler (amylopektin) inte bildas. Att det är fråga om en transposon stöds av att sekvensen liknar andra kända transposoner.

Eftersom stärkelsesyntesen inte fungerar normalt kommer istället socker att lagras. Vi ser det i del B ovan som visar de biokemiska skillnaderna mellan spritärt och mörkgrön. Sockerhalten är betydligt högre hos mörkgrön medan stärkelsehalten är lägre. Den högre sockerhalten hos mörkgrön är ett skäl till att denna variant har behållits i odling sedan Mendels tid.

Att torkade frön av mörkgrön är skrynkliga beror på att färska frön innehåller mer vatten beroende på högre sockerhalt och därmed förändrade osmotiska förhållanden. När frön av mörkgrön torkar avges vattnet och fröerna blir skrynkliga. Försöket med att väga torra respektive blötlagda frön illustrerar detta.

Ytterligare en kommentar till resultatet är att vi av miljöskäl blandade GelRed med proverna. GelRed består av stora molekyler som binder till DNA. Det medför att den korta nukleotidsekvensen hos spritärt kommer att vandra en något kortare sträcka än förväntat.



## Transposoner

Genomet hos en organism är inte så stabilt som man tidigare föreställde sig. Förändringar kan exempelvis bero på rörliga DNA-sekvenser, så kallade transposoner ("hoppande gener"), som på olika sätt kan förflyttas från en plats i en kromosom till en annan plats i samma kromosom eller till en annan kromosom. Transposoner kan på detta sätt skada gener och ge upphov till defekter och sjukdomar. Transposoner finns hos bakterier och hos eukaryota organismer inklusive människa. Transposonerna hos eukaryoter har många likheter med varandra och med dem som finns hos bakterier.

Hos däggdjur består vanligen 25–50 procent av det totala genomet av transposoner och liknande sekvenser. Hos människan finns exempelvis *Alu*-sekvenser som vardera består av cirka 300 baspar. Vi har cirka 1 miljon kopior av *Alu*-sekvenser i vårt genom som tillsammans utgör cirka 10 procent av hela genomet.

En del växter har blommor med oregelbundna prickar och fält, pelargon (nederst till vänster) är ett exempel och underblomma, *Mirabilis jalapa* (ovan till vänster) ett annat. De ljusa fälten beror på att en transposon har skadat gener som medverkar vid bildning av den röda antocyanfärgen. Se Bi-lagan nr 2 2014, Odlas en transposon.

Vilket ursprung har transposonerna? Hur har de kunnat ta så stor plats i genomet? Har de påverkat evolutionen? Detta är frågor som väcks och som återstår att arbeta vidare med.